

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02010/101047

発行日 平成24年9月6日(2012.9.6)

(43) 国際公開日 平成22年9月10日(2010.9.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 N	
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 O 1 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁)

出願番号	特願2011-502717 (P2011-502717)	(71) 出願人	000181147 持田製薬株式会社 東京都新宿区四谷1丁目7番地
(21) 国際出願番号	PCT/JP2010/052738		
(22) 国際出願日	平成22年2月23日(2010.2.23)	(74) 代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(31) 優先権主張番号	特願2009-54082 (P2009-54082)	(74) 代理人	100095360 弁理士 片山 英二
(32) 優先日	平成21年3月6日(2009.3.6)	(74) 代理人	100120134 弁理士 大森 規雄
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100149010 弁理士 星川 亮
(31) 優先権主張番号	特願2009-223493 (P2009-223493)	(74) 代理人	100104282 弁理士 鈴木 康仁
(32) 優先日	平成21年9月28日(2009.9.28)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 子宮内膜症の判定方法、および子宮内膜症の診断用キット

## (57) 【要約】

本発明は、被験者の血液試料を用いることができ、従来の子宮内膜症マーカーである C A 1 2 5 等のみを用いた従来方法よりも高感度かつ高精度で子宮内膜症を判定可能な判定方法と、当該本発明方法を実施するための診断用キットを提供することを目的とする。本発明に係る子宮内膜症の判定方法は、血液試料中における、抗シンタキシン自己抗体、抗 P D I K 1 L 自己抗体および抗エノラーゼ自己抗体から選択される少なくとも1種の発現解析を行う工程；および、上記発現解析結果により、子宮内膜症の発症の有無を判定する工程を含むことを特徴とする。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

血液試料中における、抗シタキシン自己抗体、抗 P D I K 1 L 自己抗体および抗エノラーゼ自己抗体から選択される少なくとも 1 種の発現解析を行う工程；および上記発現解析結果により、子宮内膜症の発症の有無を判定する工程；を含むことを特徴とする子宮内膜症の判定方法。

## 【請求項 2】

抗シタキシン自己抗体、抗 P D I K 1 L 自己抗体および抗エノラーゼ自己抗体から選択される少なくとも 1 種の発現解析に加え、C A 1 2 5 または C A 1 9 - 9 の発現解析を行う請求項 1 に記載の子宮内膜症の判定方法。

## 【請求項 3】

上記発現解析を免疫測定法により行う請求項 1 または 2 に記載の判定方法。

## 【請求項 4】

シタキシン、P D I K 1 L、エノラーゼ、それらの断片ペプチド、それらの変性体、それらの修飾体からなる群より選択される少なくとも一種のペプチド；および上記ペプチドへ特異的に結合する自己抗体へ結合することができ、且つ標識基を有する二次抗体；を含むことを特徴とする子宮内膜症の診断用キット。

## 【請求項 5】

上記ペプチドが担体に固定化されている請求項 4 に記載の子宮内膜症の診断用キット。

## 【請求項 6】

さらに、抗 C A 1 2 5 抗体または抗 C A 1 9 - 9 抗体、および上記抗 C A 1 2 5 抗体または抗 C A 1 9 - 9 抗体へ特異的に結合する C A 1 2 5 または C A 1 9 - 9 へ結合することができ且つ標識基を有する二次抗体を含む請求項 4 または 5 に記載の子宮内膜症の診断用キット。

## 【請求項 7】

上記抗 C A 1 2 5 抗体または抗 C A 1 9 - 9 抗体が担体に固定化されている請求項 6 に記載の子宮内膜症の診断用キット。

## 【請求項 8】

さらに、上記標識基の検出試薬、正常対照試料または子宮内膜症対照試料のいずれか 1 以上を含む請求項 4 ~ 7 のいずれかに記載の診断用キット。

## 【請求項 9】

子宮内膜症を判定するための、抗シタキシン自己抗体、抗 P D I K 1 L 自己抗体および抗エノラーゼ自己抗体から選択される少なくとも一種の使用。

## 【請求項 10】

子宮内膜症の診断用キットを作製するための、抗シタキシン自己抗体、抗 P D I K 1 L 自己抗体および抗エノラーゼ自己抗体から選択される少なくとも一種の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、子宮内膜症の有無を判定するための方法、子宮内膜症を診断するためのキット、および抗シタキシン自己抗体等の使用方法に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

子宮内膜症は、子宮内膜様の上皮細胞や間質細胞が、卵巣や卵管、また、腹腔内や直腸の表面など子宮腔内面以外の組織や臓器において、月経周期に従って増殖・出血・再生を繰り返し、組織に障害を及ぼす疾患である。子宮内膜症は、子宮内膜様組織が異所で増殖するなど悪性腫瘍と類似の特徴を有するが、あくまで良性の疾患である。しかし、子宮内膜症の原因は必ずしも明らかとなっていないが、月経のストレスが原因の一つといわれており、晩婚化や出産年齢の遅延、出産回数の低減などにより、近年、その患者数は増加

10

20

30

40

50

している。また、子宮内膜症は炎症や痛み、組織の癒着などを引き起こし、高い割合で不妊症を併発するというデータもある。よって、子宮内膜症を早期段階で検出して対処することが重要である。

【0003】

子宮内膜症に対しては、腹腔鏡検査や開腹手術による視診と組織診での確定診断が推奨されている。しかし、これら診断方法は患者に苦痛や負担を与えることから、まずはより簡便な内診、超音波検査、血液検査などが一般的に行われる。この血液検査では、CA125やCA19-9というマーカーが用いられる。

【0004】

ところがこれらCA125とCA19-9は、もともと卵巣がんなどの腫瘍マーカーであるので、子宮内膜症に特異的なものではない。また、これらマーカーを用いた診断では真陽性率が低く、且つ偽陽性率が高いという欠点がある。そこで、CA125等にとって代わり得る新たな子宮内膜症診断用マーカーが求められている。

10

【0005】

CA125等以外の子宮内膜症診断用マーカーとしては、例えば特許文献1にはNADH脱水素酵素などの遺伝子が、特許文献2にはヒスタミン放出因子が、特許文献3には組織因子経路インヒビター(TFPI-2)というタンパク質が、それぞれ開示されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

20

【0006】

【特許文献1】特表2003-531580号公報

【特許文献2】特開2005-49343号公報

【特許文献3】特表2007-506965号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

上述したように、実用化されているCA125とCA19-9以外にも、子宮内膜症の診断用マーカーは種々検討されている。

【0008】

30

しかし特許文献1~2に記載されているマーカーは、子宮内膜細胞試料における発現レベルを測定しなければならないので、試料の採取に当たり被験者に苦痛を与えるという問題がある。また、特許文献3のマーカーは、卵巣に発生する子宮内膜症性嚢胞(チョコレート嚢腫)との相関性は実験的に示されているが、卵巣以外で発生した子宮内膜症や、チョコレート嚢腫まで至らないような軽度の子宮内膜症との相関性は不明である。

【0009】

そこで本発明は、被験者の血液試料を用いることができ、従来の子宮内膜症マーカーであるCA125等のみを用いた方法よりも高感度かつ高精度で子宮内膜症を判定可能な判定方法、当該本発明方法を実施するための診断用キット、並びに子宮内膜症の判定および子宮内膜症の診断用キットを作製するための抗シタキシン自己抗体等の使用方法を提供

40

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、前記課題を解決するために鋭意研究を重ね、血液に含まれる成分から子宮内膜症の診断用マーカーとして用いることができるものを探索した。その結果、特定のタンパク質に対する自己抗体が子宮内膜症と有意な相関性を示し、従来の子宮内膜症マーカーよりも正確なマーカーとして有用であることを見出して、本発明を完成した。

【0011】

本発明に係る子宮内膜症の判定方法は；血液試料中における、抗シタキシン自己抗体、抗PD1K1L自己抗体および抗エノラーゼ自己抗体から選択される少なくとも1種の

50

発現解析を行う工程；および、上記発現解析結果により、子宮内膜症の発症の有無を判定する工程を含むことを特徴とする。

【0012】

本発明に係る子宮内膜症の診断用キットは、シタキシン、PDIK1L、エノラーゼ、それらの断片ペプチド、それらの変性体、それらの修飾体からなる群より選択される少なくとも一種のペプチド、および、上記ペプチドへ特異的に結合する自己抗体へ結合することができ、且つ標識基を有する二次抗体を含むことを特徴とする。

【0013】

本発明に係る抗シタキシン自己抗体、抗PDIK1L自己抗体および抗エノラーゼ自己抗体から選択される少なくとも一種は、子宮内膜症の判定と、子宮内膜症の診断用キットを作製するために用いることができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】本発明方法に基づいて、子宮内膜症患者、その他の疾患の患者および健常者から得た血清試料における抗エノラーゼ自己抗体の相対活性を測定した結果を示す図である。

【図2】本発明方法に基づいて、子宮内膜症患者、その他の疾患の患者および健常者から得た血清試料における抗PDIK1L自己抗体の相対活性を測定した結果を示す図である。

【図3】本発明方法に基づいて、子宮内膜症患者、その他の疾患の患者および健常者から得た血清試料における抗シタキシン5自己抗体の相対活性を測定した結果を示す図である。

20

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明に係る子宮内膜症の判定方法では、被検者の血液試料中における、抗シタキシン自己抗体、抗PDIK1L自己抗体および抗エノラーゼ自己抗体から選択される少なくとも一種の発現解析を行う。

【0016】

子宮内膜症は、子宮内膜様の上皮細胞や間質細胞が、卵巣や卵管、また、腹腔内や直腸の表面など子宮腔内面以外の組織や臓器において、月経周期に従って増殖・出血・再生を繰り返して組織に障害を及ぼす疾患であり、その重篤度に応じてステージIからステージIVまでの4段階に分けられる。本発明においては、子宮内膜症の重篤度が高いほど、その有無をより高い感度と精度で判定することができる。なお、実用化されている子宮内膜症マーカーであるCA125とCA19-9は卵巣がんなどの腫瘍マーカーでもあるので、偽陽性率が高い。それに対して本発明に係る子宮内膜症マーカーは、本発明者らによる実験によれば、異常値を除き、健常者や他の疾患の患者の偽陽性率が従来マーカーよりも低い。

30

【0017】

本発明方法で用いる血液試料の種類は特に制限されず、血液自体、血漿、血清のいずれも含まれる。但し、発現解析の対象である自己抗体は血清に含まれるので、血漿または血清を用いることが好ましく、血清を用いることがより好ましい。なお、血漿や血清を得る方法としては常法を適用すればよく、より具体的には遠心分離や濾過を用いればよい。

40

【0018】

本発明方法は、ヒトのみならず他の温血動物に対しても有効であると考えられることから、血液試料としてはヒト由来のもののみならず、他の温血動物由来のものも用いることができる。

【0019】

本発明方法では血液試料を用いることから、例えば子宮組織などを患者から切除して試料とする必要はなく、血液を採取すればよい。よって、本発明方法では患者に与える苦痛がより低減されている。

50

## 【 0 0 2 0 】

シタキシンは、細胞のエキソサイトーシスに関係する S N A R E 複合体を形成する細胞膜結合性タンパク質の一種である。

## 【 0 0 2 1 】

P D I K 1 L は、セリン/スレオニンプロテインキナーゼであり、同じくキナーゼである C L I K 1 と 6 9 % の 相 同 性 を 示 す 。 P D I K 1 L の ア ミ ノ 酸 配 列 は、L I N G C H E N G U O , et.al. , Journal of Genetics , vol.82 , nos.1 & 2 , pp.27-32 ( 2003 ) ( この 文 献 は、参 照 する こと によ り 本 明 細 書 に 援 用 さ れ る も の と す る ) に 記 載 さ れ て い る 。

## 【 0 0 2 2 】

エノラーゼは解糖系に関係する酵素の一つであり、そのアイソザイムとしては、細胞質に偏在する 型、筋肉細胞に偏在する 型、ニューロンに偏在する 型がある。

10

## 【 0 0 2 3 】

本発明では、被験者の血液試料における上記タンパク質の自己抗体の発現解析を行う。子宮内膜症患者の血液試料において、上記タンパク質の自己抗体の発現量が増加する理由は明らかではないが、これら自己抗体の発現解析により、従来マーカーよりも正確に子宮内膜症の有無を判定することが可能になる。

## 【 0 0 2 4 】

本発明に係る判定方法においては、抗シタキシン自己抗体、抗 P D I K 1 L 自己抗体および抗エノラーゼ自己抗体から選択される少なくとも1種の発現解析に加え、C A 1 2 5 または C A 1 9 - 9 の 発 現 解 析 を 行 う こと が 好 ま し い 。 抗 シ タ キ シ ン 自 己 抗 体 等 と 共 に C A 1 2 5 または C A 1 9 - 9 の 発 現 解 析 を 行 う こと によ り、子 宮 内 膜 症 を よ り 一 層 高 感 度 で 検 出 する こと が 可 能 に な る 。

20

## 【 0 0 2 5 】

発現解析の対象である抗シタキシン自己抗体としては抗シタキシン 5 自己抗体が好ましく、抗エノラーゼ自己抗体としては抗 - エノラーゼ自己抗体が好ましい。

## 【 0 0 2 6 】

本発明に係る判定方法において、シタキシン等に対する自己抗体および C A 1 2 5 等の発現解析法は、特に制限されない。例えば、血液試料中におけるこれら自己抗体の絶対量や濃度を測定することに限られず、相対的な量や濃度を測定してもよい。より具体的には、例えば、上記自己抗体等の血液試料中における量、濃度または活性を測定すればよい。

30

## 【 0 0 2 7 】

具体的な発現解析方法としては、例えば、E L I S A、プロテインチップを用いた方法、免疫比濁法、ウェスタンブロッティング法、R I A 法、化学発光酵素免疫測定法 ( C L E I A 法 )、ラテックス凝集法、電気化学発光免疫測定法 ( E C L I A 法 )、赤血球凝集反応 ( H A 法 ) などの免疫測定法を挙げることができる。

## 【 0 0 2 8 】

これら方法の中でも、上記発現解析を行うための手段としては、免疫測定法が好ましい。免疫測定法は感度や精度が高く、血中における自己抗体濃度のわずかな変化も検出可能である。

40

## 【 0 0 2 9 】

E L I S A によ り 本 発 明 に 係 る 自 己 抗 体 の 発 現 解 析 を 行 う 場 合、好 適 に は 本 発 明 に 係 る 子 宮 内 膜 症 の 診 断 用 キ ャ ッ ト を 用 い る こと が 可 能 。

## 【 0 0 3 0 】

本発明の診断用キットは、シタキシン、P D I K 1 L、エノラーゼ、それらの断片ペプチド、それらの変性体、それらの修飾体からなる群より選択される少なくとも一種のペプチド、および、上記ペプチドへ特異的に結合する自己抗体へ結合することができ、且つ標識基を有する二次抗体を含む。

## 【 0 0 3 1 】

上記診断用キットとしては、さらに、抗 C A 1 2 5 抗体または抗 C A 1 9 - 9 抗体、お

50

よび上記抗CA125抗体または抗CA19-9抗体へ特異的に結合するCA125またはCA19-9へ結合することができ且つ標識基を有する二次抗体を含むものが好適である。かかるキットを用いれば、抗シタキシン自己抗体等の発現解析に加えてCA125またはCA19-9の発現解析を行うことができ、これら解析結果を組み合わせることにより一層正確な子宮内膜症の判定が可能になる。

【0032】

シタキシン等の断片ペプチドは、シタキシン等の一部であって、上記自己抗体が特異的に結合できるものをいう。これら断片ペプチドとしては、例えば、シタキシン等の自己抗体のエピトープ自体や、エピトープを含むペプチドなどを挙げるができる。なお、本発明に係る自己抗体が結合するエピトープは、ELIスポットアッセイ、細胞内サイトカイン染色法、フローサイトメトリー法、T細胞増殖アッセイ等の公知方法により決定すればよい。

10

【0033】

シタキシン等の変性体は、上記自己抗体が特異的に結合できるものであって、加熱、凍結、紫外線などの物理的処理や、界面活性剤や変性剤などによる化学的処理を施されたものをいう。例えば、SDSやDTTにより処理したものを挙げるができる。

【0034】

シタキシン等の修飾体は、上記自己抗体が特異的に結合できるものであって、1以上のアミノ酸が修飾されているものをいう。例えば、グルタルアルデヒドを作用させたものを挙げるができる。

20

【0035】

本発明では、上記ペプチドとして、シタキシン等の断片ペプチドであって且つ変性処理されたものや、変性体で且つ化学修飾体であるシタキシン等も用い得る。

【0036】

上記ペプチドは、上記自己抗体が特異的に結合できる限りにおいて、1または数個のアミノ酸残基の変異、置換、欠失および/または付加があってもよい。

【0037】

本発明に係る診断用キットにおいて、上記ペプチドや抗CA125抗体等は、担体に固定化されていてもよい。担体を用いることにより、これらペプチド等を試料から分離し易くなるなどの利点が生じる。上記ペプチド等を固定化すべき担体は、診断用キットにおいて一般的に用いられているものであれば特に制限されない。例えば、担体の素材としてはポリスチレン、ポリアミド、ポリアクリルアミドなどの樹脂；シリカゲル；ガラス；綿などを挙げることができ、担体の形状としては、ビーズ、フィルム、糸、不織布、不定形ゲルなどを挙げるができる。

30

【0038】

かかる診断用キットを用いる場合には、上記ペプチド等へ、被験者の血液試料を作用させる。その結果、血液試料中に本発明に係るペプチド等に対する自己抗体やCA125等が含まれていれば、ペプチド等へ特異的に結合する。次いで、バッファーなどで非特異的にペプチド等へ結合したタンパク質等を洗浄除去した後、上記二次抗体を作用させる。二次抗体は、上記ペプチド等に結合した上記自己抗体等へ結合する。かかる二次抗体を、標識基に応じた方法で検出する。

40

【0039】

上記標識基としては、生化学分野で一般的に用いられるものを用いればよい。例えば、蛍光発色基や、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼなどの酵素を挙げるができる。これら酵素は、検出試薬を作用させることにより発光等させることが可能となる。例えば、標識基としてペルオキシダーゼを用いた場合には、ペルオキシダーゼによる酸化で発色する発色試薬や、ペルオキシダーゼの作用で過酸化塩から生じる $O_2^{2-}$ に応じて発色する発色試薬などにより、検出できる。

【0040】

血液試料に含まれる自己抗体の濃度や量は、発色強度などにより間接的に得られる。得

50

られた測定値を、検量線などにより、相対的または絶対的な濃度、量、活性などに換算してもよい。

【0041】

本発明の診断用キットとしては、正常対照試料や子宮内膜症対照試料を含むものも好ましい。これら試料が付属していれば、これら試料について同様の実験を行い、その測定値と被検試料の結果とを比較することによって、被験者における子宮内膜症の有無の判定をより客観的に行うことができる。

【0042】

プロテインチップを用いた方法では、上記ペプチド等が担持されたプロテインチップを用いる。かかるプロテインチップに血液試料を作用させれば、本発明に係る自己抗体が特異的に結合する。次いで、バッファーなどで非特異的に結合したタンパク質等を洗浄除去した後、結合した自己抗体を常法により検出すればよい。

10

【0043】

かかる検出方法としては、例えば、MALDI-TOF-MASSやSELDI-TOF-MASSなどのTOF-MASSを挙げることができる。TOF-MASSチャートから、分子量ピークやその他の断片ピーク、それらの強度などにより、自己抗体の濃度や量を把握できる。その他、ELISAの場合と同様に、標識基を有し且つ各自己抗体へ結合できる二次抗体を用い、プロテインチップへ選択的に結合した自己抗体を検出することも可能である。

【0044】

免疫比濁法を利用する場合、血液試料中の本発明に係る自己抗体へ特異的な抗原を結合させた上で特定の光を照射し、生じた不溶性複合体の量に応じた濁度を測定することにより自己抗体の濃度や量を求める。よって、自己抗体の濃度や量は濁度に応じた相対値として得られるが、事前に作成した検量線を用いることによって、絶対的な量や濃度を求めることも可能である。

20

【0045】

化学発光酵素免疫測定法(CLEIA法)の場合、血液試料中の各自己抗体を、フェライト粒子などへ固定化した上記ペプチド等と標識抗体とで挟み、抗原抗体反応複合体を形成する。次いで、発光基質など標識基に応じた検出用化合物などを添加した上で、発光量を測定すればよい。なお、フェライト粒子を用いた場合には、磁石などを使うことにより必要な複合体を精製することが可能である。

30

【0046】

本発明方法においては、次いで、得られた発現解析結果から子宮内膜症の発症の有無を判定する。即ち、子宮内膜症が発症していれば、或いはその症状が重いほど、血液中における本発明に係る自己抗体の濃度や量は高まる。よって、本発明に係る自己抗体の発現解析結果より、その発現量が多ければ陽性と判断でき、その発現量が少なければ陰性と判断できる。

【0047】

実際には、子宮内膜症の定義や重篤度、本発明に係る自己抗体の発現解析方法によって、陽性と陰性の境界、即ちカットオフ値が変わり得る。従って、一般的な基準が無い段階では、本発明方法の実施者が発現解析方法やカットオフ値を予備実験などにより事前に決定した上で、測定を行う必要がある。

40

【0048】

さらに本発明方法においては、抗シタキシン自己抗体等の発現解析と共に、従来マーカーであるCA125またはCA19-9の発現解析を行い、抗シタキシン自己抗体等とCA125等のいずれか一方がそれぞれのカットオフ値を超えた場合に子宮内膜症陽性と判断するにすれば、子宮内膜症をより一層高感度で検出することが可能になる。

【実施例】

【0049】

以下、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はもとより下記実施例

50

によって制限を受けるものではなく、前・後記の趣旨に適合し得る範囲で適当に変更を加えて実施することも勿論可能であり、それらはいずれも本発明の技術的範囲に包含される。

【0050】

実施例1 子宮内膜症マーカーの探索

(1) 血清試料の採取

20～50歳の子宮内膜症患者（平均年齢：34.7±7.6（平均値±標準偏差）歳）51人、22～34歳女性健常者（平均年齢：26.4±3.7）18人、17～48歳の子宮内膜症以外の疾患に罹患している患者（平均年齢：32.8±9.3）18人から、血液を採取した。なお、子宮内膜症以外の患者の疾病は、表1に示すとおりである。

10

【0051】

【表1】

表1

疾病	人数	疾病	人数
卵巣嚢胞	4	子宮内膜がん	1
子宮平滑筋腫	6	中隔子宮	1
卵管閉塞	2	原発性無月経(ターナー症候群)	1
卵巣がん	2	胞状奇胎	1

【0052】

採取した各血液を凝血促進剤と共にチューブへ入れ、室温で1～2時間静置した。次いで、分離した血清部分を取得し、試験に用いるまで-20℃で保存した。

20

【0053】

(2) 全タンパク質の取得

ヒト悪性胸膜中皮腫細胞（理化学研究所，ACC-Meso-1 Cells）を入手し、10%ウシ胎仔血清と100μg/mLアミノベンジルペニシリン（10%ダルベッコ改変イーグル培地溶液）を添加したダルベッコ改変イーグル培地を用い、5%CO<sub>2</sub>中、37℃で培養した。細胞は、一週間に二回、10%ダルベッコ改変イーグル培地で継代培養した。

【0054】

上記のとおり培養したヒト悪性胸膜中皮腫細胞を集め、8M尿素、2%Nonidet P-40（界面活性剤）、2%2-メルカプトエタノールおよび10mM PMSF（プロテアーゼ阻害剤）を含む4質量倍の可溶化バッファーと混合し、超音波ホモジェナイザー（ブランソン社製，Sonifier 250）を使って溶解した。10,000rpm、4℃で12分間遠心分離した後、タンパク質を含む上清を取得し、試験に付すまで-80℃で保存した。

30

【0055】

上記上清を室温まで戻した後、その10～50μgを、0.5%IPGバッファーとpI3-10（GEヘルスケアバイオサイエンス社製）を含む可溶化バッファーからなるサンプルローディングバッファーと混合した。次いで、一次元目用電気泳動ゲル（GEヘルスケアバイオサイエンス社，Immobiline DryStrip，pH3～10，7cm）をセットした等電点電気泳動装置（GEヘルスケアバイオサイエンス社製，Ettan IPGphor II）に調整試料をロードして電気泳動を行い、次いで二次元目用電気泳動ゲルである10%アクリルアミドゲル（バイオクラフト社製）を用いて二次元目のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。また、別途、細胞溶解物に含まれる全タンパク質の濃度を、D/Cタンパク質アッセイキット（バイオラッド社製）を使って測定した。電気泳動後、ゲル中のタンパク質をPVD膜（ミリポア社製）に移した。非特異的な吸着を防ぐために、5%脱脂乳と0.1%Tween 20の0.1%PBS溶液を用い、当該膜を室温で1時間ブロックした。

40

【0056】

(3) 子宮内膜症マーカーの決定

上記(1)で得た血清試料のうち、子宮内膜症患者由来の3個の試料と、健常者由来の

50

4個の試料を室温まで温めて、5% BSAで1000倍に希釈した。上記PVDF膜を、当該血清希釈試料と、0.1% Tween 20を0.1%の濃度でBSAの5% PBS溶液に溶解した溶液とで、室温で1時間インキュベートした。当該PVDF膜をTween 20の0.1% PBS溶液で3回洗浄した後、抗ヒトIgGのHRP標識体（サンタ・クルーズ・バイオテクノロジー社製）の5% BSA - PBS溶液中、室温で1時間インキュベートした。4回洗浄した後、ECL溶液（GEヘルスケアバイオサイエンス社製）を作用させることにより、血清試料中に含まれる抗体へ特異的に結合されるタンパク質のスポットを発光させ、化学発光用フィルム（GEヘルスケアバイオサイエンス社製，HyperFilm ECL）で撮影した。また、当該二次元電気泳動ゲルは、別途、クーマシーブリリアントブルー（CBB）で直接染色した。

10

## 【0057】

血液試料に含まれる抗体のうち子宮内膜症患者に特異的なものに結合されたタンパク質を特定するために、MALDI TOF - MSシステム（アプライドバイオシステム社製，Voyager DE-PRO）を用い、ペプチドマスフィンガープリント法を実施した。CBB染色した二次元電気泳動ゲルのスポットのうち子宮内膜症患者に特異的なものを、メスで切除した。炭酸水素アンモニウムを50%アセトニトリルに溶解して12.5 mM溶液（pH 8.0）を得、当該溶液（400 μL）中、各スポットを室温で15分間インキュベートした後、上清を吸引除去した。かかる工程を3回繰り返した。次いで、100%アセトニトリル（400 μL）中、各スポットを室温で5分間インキュベートした後、アセトニトリルを吸引除去した。各スポットをエバポレーター（タイテック社製，VC-36N）で乾燥した後、トリプシンを25 mM炭酸水素アンモニウム溶液に溶解した15 μg/mL溶液（15～30 μL，pH 8.0，プロメガ社製）に添加混合し、37℃で一晩インキュベートした。次に、当該スポットゲルを50%アセトニトリルと5%トリフルオロ酢酸を含む水溶液（25～50 μL）と混合し、60分間緩やかに攪拌した。かかる抽出操作を再度繰り返し、得られた溶液を合わせ、減圧濃縮した。得られた残渣を0.1%トリフルオロ酢酸水溶液（10 μL）に溶解し、ZipTip C18（ミリポア社製）を通した。ZipTipと0.1%トリフルオロ酢酸水溶液を使った洗浄を5回繰り返した後、ZipTip内の試料を30%アセトニトリル（2 μL）で溶出した。次に、溶出液（0.5 μL）をMALDI TOF - MSシステム（アプライドバイオシステム社製，Voyager DE-PRO）の試料プレートにロードした。同容量のマトリックス溶液、α-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸（シグマ社製）の50%アセトニトリル溶液、5%トリフルオロ酢酸と混合した後、当該試料プレートをエバポレーターで乾燥した。MALDI TOF - MSシステム（アプライドバイオシステム社製，Voyager DE-PRO）とSequezyme peptide mass standards kit（アプライドバイオシステムズ社製）を使ってTOF - MS解析を行った。得られたTOF - MSデータを、<http://trypsin.nichd.nih.gov/ucsfhtml3.2/msfit.htm>のプロテイン・インスペクター・ページ中のNCBINr.2005.01.06データベースを用い、MS - Fitプログラムソフトウェアプログラムver.3.2.1で、ペプチドマスを150 ppmにして解析した。その際、一つのペプチドごとに一つの不完全開裂を考慮し、pI範囲には制限を設けなかった。MALDI TOF - MS解析は、一つの試料につき最低でも3回行った。特定されたタンパク質を以下に示す。

20

30

40

## 【0058】

## 【表2】

表2

	等電点	分子量
α-エノラーゼ	5.8	49478
PDIK1L	6.4	38546
シタキシン5	9.0	34086

## 【0059】

以上の結果のとおり、子宮内膜症患者の血清試料中に特異的に含まれる自己抗体が結合

50

するタンパク質は、 $\alpha$ -エノラーゼ、PDIK1Lおよびシタキシン5であることが分かった。

【0060】

実施例2 本発明に係る自己抗体の各血清試料中相対活性値の測定

(1) 組み換えタンパク質の調製

ヒト悪性胸膜中皮腫細胞(理化学研究所, ACC-Meso-1 Cells)からcDNAを調製し、PCR反応により、それぞれグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)が融合した、 $\alpha$ -エノラーゼ、PDIK1Lおよびシタキシン5をコードする遺伝子を増幅した。増幅された遺伝子を大腸菌に導入して形質転換し、GST融合 $\alpha$ -エノラーゼ、GST融合PDIK1LおよびGST融合シタキシン5を得た。

10

【0061】

(2) ELISAによる血清試料中の各自己抗体の相対活性値の測定

上記で調製したGST融合タンパク質を用いたELISAを実施することにより、上記実施例1(1)の血清試料中における $\alpha$ -エノラーゼ、PDIK1Lおよびシタキシン5の自己抗体の相対活性値を測定した。

【0062】

各GST融合タンパク質を0.1M炭酸バッファー(pH9.5)で希釈し、当該液の100 $\mu$ LをELISAプレート(コーニング社製, #3369)のウェルへ、最終濃度1 $\mu$ g/mLで加えた。当該プレートを4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートして各タンパク質を固定化した後、Tween20の0.05%PBS溶液で4回洗浄した。各ウェルへ1%BSA-PBS(100 $\mu$ L)を加えた。

20

【0063】

アッセイ開始時に1%BSA-PBSを除去し、1%BSA-PBSで2000倍に希釈した各血清試料(100 $\mu$ L)をウェルに加え、室温で1時間インキュベートした。次いで、抗ヒトIgGのHRP標識体(サンタ・クルーズ・バイオテック社製, 100 $\mu$ L)を加え、室温で1時間インキュベートした。洗浄後、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を0.01%含有する0.05M酢酸ナトリウムバッファー(pH5.5)にテトラメチルベンジジンを溶解した10mg/mL溶液(100 $\mu$ L)を加え、室温で30分間インキュベートした。次に、10%希硫酸(50 $\mu$ L)を加えて反応を停止させた。マルチスキャンELISAリーダー(ラボシステムズ社製)を使い、450/620nmの光学密度を測定した。測定は各試料につき3回繰り返し、得られた平均値をデータ解析に用いた。

30

【0064】

別途、標準的な血清を選択し、1%BSA-PBSで2000倍に希釈した後、同様に光学密度を測定した。さらに、125~8000倍希釈の血清とブランクについても、同様に測定した。2000倍希釈液における各自己抗体の活性を1000unit/mLと仮定し、各自己抗体の相対的な活性値と光学密度について検量線を作成した。

【0065】

各血清試料における、抗 $\alpha$ -エノラーゼ自己抗体、抗PDIK1L自己抗体および抗シタキシン5自己抗体の相対的な活性値を、光学密度の測定値と上記検量線により求めた。統計的解析は、ウェルチのt検定により行い、ROC(Receiver Operating Characteristic)プロットを計算した。抗 $\alpha$ -エノラーゼ自己抗体の結果を図1に、抗PDIK1L自己抗体の結果を図2に、抗シタキシン5自己抗体の結果を図3に示す。

40

【0066】

図1のとおり、子宮内膜症患者の血清試料中における抗 $\alpha$ -エノラーゼ自己抗体の相対活性値は、健常者に比べてp=0.0079の危険率で有意に高く、子宮内膜症以外の疾患の患者に比べてp=0.024の危険率で、有意に高い。

【0067】

また、図2のとおり、子宮内膜症患者の血清試料中における抗PDIK1L自己抗体の相対活性値は、健常者に比べてp=0.00026の危険率で有意に高く、子宮内膜症以外の疾患の患者に比べてp=0.0071の危険率で、有意に高い。

50

【0068】

さらに、図3のとおり、子宮内膜症患者の血清試料中における抗シタキシン5自己抗体の相対活性値は、健常者に比べて $p = 0.00070$ の危険率で有意に高く、子宮内膜症以外の疾患の患者に比べて $p = 0.014$ の危険率で、有意に高い。

【0069】

なお、従来の子宮内膜症のマーカーであるCA125について、血清試料中における相対活性を、愛媛医療研究所で放射免疫測定法により測定した。その結果、カットオフ値は $35 \text{ unit/mL}$ と低いレベルにあり、特に他の疾患の患者や健常者の血清試料でも当該カットオフ値を超える値を示す場合がかなり多く、偽陽性のケースが見られた。

【0070】

それに対して、上記実験において、それぞれのカットオフ値は、抗-エノラーゼ自己抗体の場合で $400 \text{ unit/mL}$ 、抗PDIK1L自己抗体の場合で $310 \text{ unit/mL}$ 、抗シタキシン5自己抗体の場合で $470 \text{ unit/mL}$ とした。図1~3のとおり、これらカットオフ値を採用すれば、他の疾患の患者と健常者の血清試料の測定値のうち異常値を示す数例を除き、偽陽性のケースは見られない。

【0071】

以上のとおり、本発明に係る方法によれば、従来の方法よりも子宮内膜症の有無をより正確に判定できることが実証された。

【0072】

実施例3 CA125の併用

表3に示す20~50歳の子宮内膜症患者65人、22~51歳女性健常者(平均年齢: $35.0 \pm 3.7$ )39人、17~50歳の子宮内膜症以外の疾患に罹患している患者(平均年齢: $33.9 \pm 9.3$ )31人から、血液を採取し、上記実施例1(1)と同様にして血清試料を得た。なお、子宮内膜症以外の患者の疾病は、表4に示すとおりである。

【0073】

【表3】

表3

ステージ	人数	年齢(平均±標準偏差, 範囲)	子宮内膜症性嚢胞の有無	月経困難症の有無
I	13	34.8±8.0, 22-50	0/13	9/13
II	11	35.2±9.0, 22-48	2/11	8/11
III	18	36.6±7.8, 23-49	13/18	13/18
IV	23	33.9±7.2, 20-50	21/23	19/23
合計	65	35.0±7.9, 20-50	36/65	49/65

【0074】

【表4】

表4

疾病	人数	疾病	人数
卵巣嚢胞	9	子宮頸がん	2
子宮平滑筋腫	7	子宮内膜増殖症	1
卵管閉塞	3	中隔子宮	1
不妊症	2	原発性無月経(ターナー症候群)	1
卵巣がん	2	胎状奇胎	1
子宮内膜がん	2		

【0075】

上記実施例2(2)と同様にして、血清試料に含まれる-エノラーゼの自己抗体およびCA125の相対活性(U/mL)を測定し、ウェルチのt検定により統計的解析を行った。結果を、下記実施例4の結果と共に表7に示す。

【0076】

また、上記実施例2(2)と同様に、抗-エノラーゼ自己抗体を子宮内膜症マーカーとする場合は血清試料におけるカットオフ値を $400 \text{ U/mL}$ に、CA125の場合はカットオフ値を $35 \text{ U/mL}$ に設定し、抗-エノラーゼ自己抗体がカットオフ値を超えた

10

20

30

40

50

場合と、 $\alpha$ -エノラーゼの自己抗体とCA125のいずれか一方がそれぞれのカットオフ値を超えた場合について、感度： $(\text{真陽性者数} / \text{子宮内膜症患者数}) \times 100$ 、特異度： $[(\text{真陰性者数} / (\text{総被験者数} - \text{子宮内膜症患者数}))] \times 100$ 、正診率： $[(\text{真陽性者} + \text{真陰性者数}) / \text{総被験者数}] \times 100$ を算出した。なお、前記式において、「真陽性」とは子宮内膜症患者が陽性を示す場合であり、「真陰性」とは、健常者および子宮内膜症以外の疾患に罹患している患者が陰性を示す場合である。結果を、下記実施例4の結果と共に表8に示す。

【0077】

実施例4 CA125の併用

表5に示す20～51歳の子宮内膜症患者69人、22～51歳女性健常者（平均年齢：34.2±9.3）44人、18～48歳の子宮内膜症以外の疾患に罹患している患者（平均年齢：34.4±8.2）38人から、血液を採取し、上記実施例1（1）と同様にして血清試料を得た。なお、子宮内膜症以外の患者の疾病は、表6に示すとおりである。

【0078】

【表5】

表5

ステージ	人数	年齢(平均±標準偏差, 範囲)	子宮内膜症性嚢胞の有無	月経困難症の有無
I	11	37.1±8.7, 23-50	0/11	8/11
II	10	36.1±10.2, 22-49	3/10	6/10
III	20	34.1±7.2, 22-48	16/20	14/20
IV	28	34.9±7.2, 20-51	27/28	22/28
合計	69	35.2±8.0, 20-51	46/69	50/69

【0079】

【表6】

表6

疾病	人数	疾病	人数
卵巣嚢胞	9	卵管閉塞	2
子宮平滑筋腫	8	子宮頸がん	2
卵巣がん	4	中隔子宮	1
子宮内膜がん	4	原発性無月経(ターナー症候群)	1
不妊症	3	胞状奇胎	1
腺筋症	3		

【0080】

上記実施例2（2）と同様にして、血清試料に含まれるPDIK1Lおよびシンタキシン5の自己抗体ならびにCA125の相対活性（U/mL）を測定し、ウェルチのt検定により統計的解析を行った。結果を表7に示す。なお、CA125の項においては、上段が実施例3での結果を示し、下段が実施例4での結果を示す。

【0081】

【表7】

表7

	その他の疾患患者	健常者	子宮内膜症患者	危険率	
				健常者 vs 子宮内膜症患者	その他の疾患患者 vs 子宮内膜症患者
$\alpha$ -エノラーゼ	236.5±119.7	223.9±113.8	348.6±225.1	p=0.00035**	p=0.0022*
PDIK1L	203.4±129.5	155.8±95.2	370.2±212.5	p=8.4×10 <sup>-11</sup> **	p=2.4×10 <sup>-5</sup> **
シンタキシン5	287.9±161.8	201.5±107.2	505.4±381.0	p=2.0×10 <sup>-8</sup> **	p=9.0×10 <sup>-6</sup> **
CA125	38.5±54.2	21.5±5.1	43.0±44.3	p=0.00028**	p=0.693 <sup>ns</sup>
	281.9±1494.1	20.9±10.5	54.4±145.7	p=0.063 <sup>ns</sup>	p=0.36 <sup>ns</sup>

\*\*：危険率p<0.001で有意差がある場合

\*：危険率p<0.01で有意差がある場合

ns：有意差が無い場合

【0082】

上記結果のとおり、従来CA125をマーカーとした場合、特に子宮内膜症以外の疾患に罹患した患者に対しては、子宮内膜症を有意に検出することができない。それに対し

て本発明に係るマーカーを指標とする場合、健常者に対してのみならず、子宮内膜症以外の患者に対しても、子宮内膜症を低危険率で有意に検出できることが実証された。

【 0 0 8 3 】

また、上記実施例 2 ( 2 ) と同様に、抗 P D I K 1 L 自己抗体を子宮内膜症マーカーとする場合は血清試料におけるカットオフ値を 3 1 0 U / m L に、抗シンタキシン 5 自己抗体の場合はカットオフ値を 4 7 0 U / m L に、C A 1 2 5 の場合はカットオフ値を 3 5 U / m L に設定し、抗 P D I K 1 L 自己抗体がカットオフ値を超えた場合、抗シンタキシン 5 自己抗体がカットオフ値を超えた場合、抗 P D I K 1 L 自己抗体と C A 1 2 5 のいずれか一方がそれぞれのカットオフ値を超えた場合および抗シンタキシン 5 自己抗体と C A 1 2 5 のいずれか一方がそれぞれのカットオフ値を超えた場合について、感度、選択性および正確性を算出した。結果を表 8 に示す。

10

【 0 0 8 4 】

【表 8】

表8

		感度	特異度	正診率
α-エノラーゼ		36.9%	91.4%	65.2%
PDIK1L		59.4%	84.1%	70.2%
シンタキシン5		58.0%	80.5%	70.2%
CA125 +	α-エノラーゼ	60.0%	81.4%	71.1%
	PDIK1L	73.9%	72.0%	69.5%
	シンタキシン5	72.5%	67.1%	69.5%

20

【 0 0 8 5 】

上記結果のとおり、本発明に係るマーカーと従来 of C A 1 2 5 のいずれか一方を指標とする場合には、本発明マーカーのみを指標とする場合に比して、選択性は低下する傾向にあり、正確性はほぼ同等である一方で、感度は顕著に向上した。かかる結果より、初期の子宮内膜症をできるだけもれなく検出する必要がある場合には、本発明マーカーに加えて C A 1 2 5 を併用すれば、より一層感度良く子宮内膜症を検出できることが分かった。

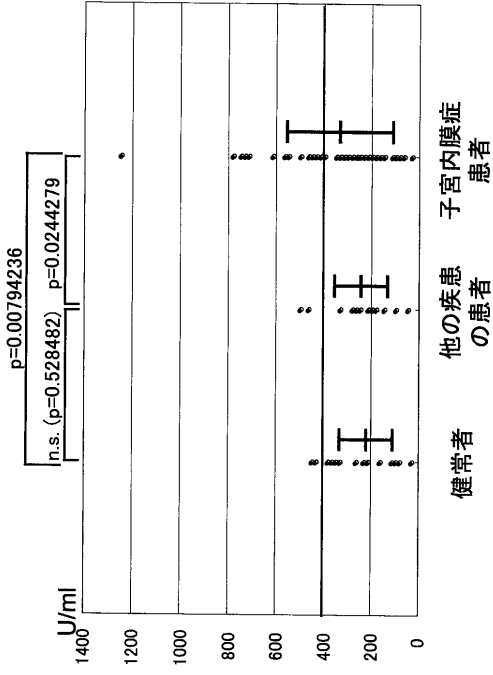
【産業上の利用可能性】

【 0 0 8 6 】

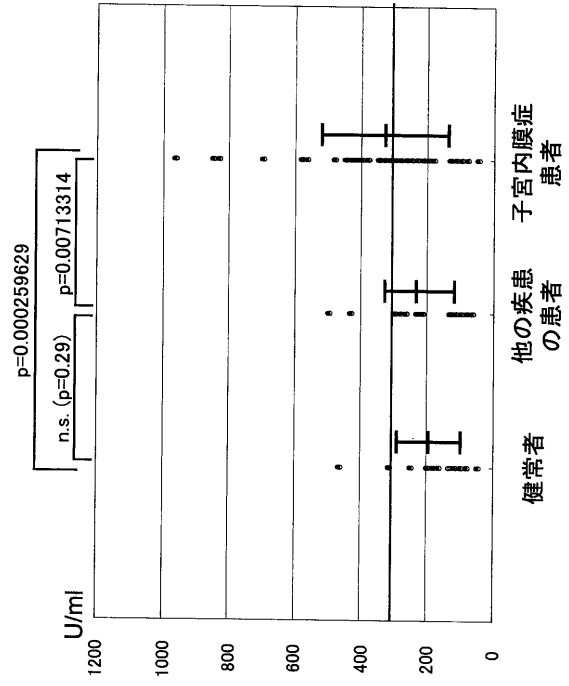
本発明によれば、従来の子宮内膜症マーカーよりも高感度かつ高精度で子宮内膜症の有無を判定可能である。また、本発明においては、子宮組織試料を取得する必要は無く、血液試料で判定できるので、被験者に与える苦痛も少ない。よって本発明は、近年、患者数が増えている子宮内膜症の有無を簡便かつ正確に判定可能なものであり、非常に有用である。

30

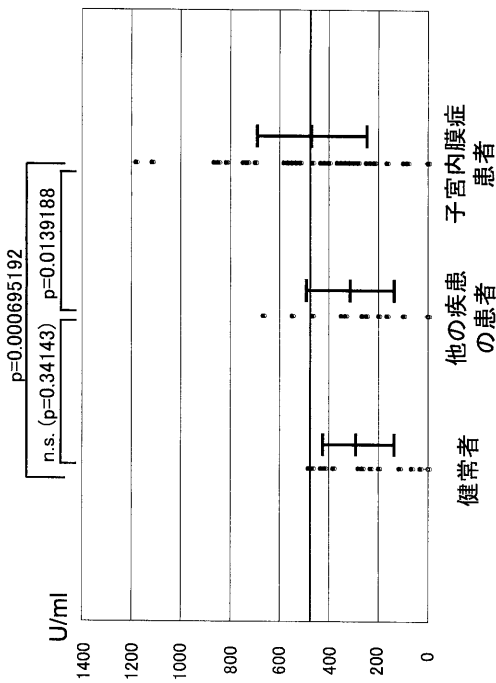
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/052738

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/53(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/53		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2010 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/MEDLINE/ BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Hiroataka OTA, "Shikyu Naimakusho Oyobi Shikyu Senkinsho no Shinryo ni Okeru Korinshishitsu Kotai Sokutei no Yuyodo", SRL Hokan, 1992, vol.16, no.2, pages 93 to 96, 2. Kekka	1-10 (Partial)
A	Hiroataka OTA, "Tashihyo no Tokeiteki Kaiseiki o Mochiita Shikyu Senkinsho no Shindanteki Yukosei", Japanese Journal of Fertility and Sterility, 1994, vol.39, no.3, pages 261 to 265, 2. Shindan Kijun	1-10 (Partial)
A	OTA H, Autoantibody sensitivity in the endometriosis and adenomyosis, Japanese Journal of Fertility and Sterility, 1991, Vol.36, No.4, Page.799-804 Abstracts	1-10 (Partial)
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 22 April, 2010 (22.04.10)	Date of mailing of the international search report 18 May, 2010 (18.05.10)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/052738

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Motoo NABETA, Yasuhito ABE, Risa KAGAWA, Katsumi KITO, Yasuki KUSANAGI, Mikifumi YOKOYAMA, Norifumi UEDA, Masaharu ITO, "MALDI TOF-MS o Mochiita Aratana Shikyu Naimakusho Shindan Marker no Tansakuho", Ehime Medical Journal, 01 March 2009 (01.03.2009), vol.28, no.1, pages 5 to 10, entire text	1-10 (Partial)
A	Motoo NABETA, Yasuhito ABE, Yasuki KUSANAGI, Mikifumi YOKOYAMA, Hiroshi YANO, Masaharu ITO, "Shikyu Naimakusho Kanja Kesseichu no Shinki Shindan Marker no Tansaku", Acta Obstetrica et Gynaecologia Japonica, 2008, vol.60, no.2, page 774 P3-131, entire text	1-10 (Partial)
A	Junko INAGAKI, Koji AOKI, Eiji MATSUURA, "Shikyu Naimakusho to Ko Laminin-1 Kotai", Clinical Immunology, 2003, vol.39, no.5, pages 575 to 581, Shikyu Naimakusho to Ko Laminin-1 Kotai Shikyu Naimakusho ni Okeru Ko Laminin-1 Kotai no Sokutei Igi	1-10 (Partial)
A	Fumitaka SAJI, Shoji KAMIURA, Tadashi KIMURA, Toshiya YAMAMOTO, "Shikyu Naimakusho to Men'eki", Obstetrical and Gynecological Therapy, 2001, vol.83, no.4, pages 419 to 424, Ko Shikyu Naimaku Jiko Kotai Shikyu Naimakusho ni Okeru Ko transferrin Kotai to Ko $\alpha$ 2-HS glycoprotein Kotai	1-10 (Partial)
A	Naohiko UMESAKI, Tetsuji TANAKA, Masato MIYAMA, Kuniko MIZUNO, Sachio OGITA, "Shikyu Naimakusho to Men'eki", Obstetrical and Gynecological Therapy, 1999, vol.78, no.2, pages 159 to 164, 2. Jiko Kotai	1-10 (Partial)
A	Yuji TAKETANI, "Shikyu Naimakusho to Jiko Men'eki", Obstetrical and Gynecological Therapy, 2002, vol.84, no.6, pages 1120 to 1124, 2. Zoki Hi Tokuiteki Ekisei Jiko Kotai	1-10 (Partial)
P,X	Motoo NABETA, Yasuhito ABE, Tatsuma HARAGUCHI, Katsumi KITO, Yasuki KUSANAGI, Norifumi UEDA, Masaharu ITO, "Proteome Kaiseki de Miidashita Aratana Kecchu Jiko Kotaisei Shikyu Naimakusho Marker", Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Koen Yoshishu, 2009.12, vol.32nd, no.vol.2, page 254 2P-0858	1-10 (Partial)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/052738

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
(See extra sheet.)

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:  
Claims 1 to 10 (parts).
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2010/052738

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Use of an autoantibody as an endometriosis marker is disclosed in document 1 (Hirota OTA, "Shikyu Naimakusho Oyobi Shikyu Senkinsho no Shinryo ni Okeru Korinshishitsu Kotai Sokutei no Yuyodo", SRL Hokan, 1992, vol.16, no.2, pages 93 to 96, 2. Kekka) and, therefore, cannot be considered as a special technical feature. Thus, the special technical feature in the parts of the inventions in claims 1 to 10 relating to the diagnosis of endometriosis by analyzing the expression of an anti-syntaxin autoantibody (first invention) is use of an anti-syntaxin antibody as an endometriosis marker; the special technical feature in the parts of the inventions in claims 1 to 10 relating to the diagnosis of endometriosis by analyzing the expression of anti-PDIK1L autoantibody (second invention) is use of an anti-PDIK1L antibody as an endometriosis marker; and the special technical feature in the parts of the inventions in claims 1 to 10 relating to the diagnosis of endometriosis by analyzing the expression of an anti-enolase autoantibody (third invention) is use of an anti-enolase antibody as an endometriosis marker.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2010/052738									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2010年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2010年	日本国実用新案登録公報	1996-2010年	日本国登録実用新案公報	1994-2010年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2010年										
日本国実用新案登録公報	1996-2010年										
日本国登録実用新案公報	1994-2010年										
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/MEDLINE/ BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIL)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
A	太田博孝, 子宮内膜症および子宮腺筋症の診療における抗燐脂質抗体測定の有用度, SRL宝函, 1992, Vol. 16, No. 2, Page. 93-96 2. 結果	1-10 (部分的)									
A	太田博孝, 多指標の統計的解析を用いた子宮腺筋症の診断的有効性, 日本不妊学会雑誌, 1994, Vol. 39, No. 3, Page. 261-265 2. 診断基準	1-10 (部分的)									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 22.04.2010		国際調査報告の発送日 18.05.2010									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 三木 隆	2J 3312								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3252									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 0 / 0 5 2 7 3 8
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	OTA H, Autoantibody sensitivity in the endometriosis and adenomyosis, 日本不妊学会雑誌, 1991, Vol.36, No.4, Page.799-804 Abstracts	1-10 (部分的)
A	鍋田基生, 阿部康人, 香川里沙, 木藤克己, 草薙康城, 横山幹文, 植田規史, 伊藤昌春, MALDI TOF-MSを用いた新たな子宮内膜症診断マーカーの探索法, 愛媛医学, 2009.03.01, Vol.28, No.1, Page.5-10 全文	1-10 (部分的)
A	鍋田基生, 阿部康人, 草薙康城, 横山幹文, 矢野浩史, 伊藤昌春, 子宮内膜症患者血清中の新規診断マーカーの探索, 日本産科婦人科学会雑誌, 2008, Vol.60, No.2, Page.774 P3-131 全文	1-10 (部分的)
A	稲垣純子, 青木耕治, 松浦栄次, 子宮内膜症と抗ラミニン-1抗体, 臨床免疫, 2003, Vol.39, No.5, Page.575-581 子宮内膜症と抗ラミニン-1抗体 子宮内膜症における抗ラミニン-1抗体の測定意義	1-10 (部分的)
A	佐治文隆, 上浦祥司, 木村正, 山本敏也, 子宮内膜症と免疫, 産婦人科治療, 2001, Vol.83, No.4, Page.419-424 抗子宮内膜自己抗体 子宮内膜症における抗 transferrin 抗体と抗 $\alpha$ 2-HS glycoprotein 抗体	1-10 (部分的)
A	梅咲直彦, 田中哲二, 深山雅人, 水野久仁子, 萩田幸雄, 子宮内膜症と免疫, 産婦人科治療, 1999, Vol.78, No.2, Page.159-164 2. 自己抗体	1-10 (部分的)
A	武谷雄二, 子宮内膜症と自己免疫, 産婦人科治療, 2002, Vol.84, No.6, Page.1120-1124 2. 臓器非特異的液性自己抗体	1-10 (部分的)
PX	鍋田基生, 阿部康人, 原口竜摩, 木藤克己, 草薙康城, 植田規史, 伊藤昌春, プロテオーム解析で見出した新たな血中自己抗体性子宮内膜症マーカー, 日本分子生物学会年会講演要旨集, 2009.12, Vol.32nd No. Vol.2 Page.254 2P-0858	1-10 (部分的)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 0 / 0 5 2 7 3 8

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求項 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2.  請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。  
別紙参照

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。  
請求項1-10 (部分的)
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2010/052738

**第III欄**

自己抗体を子宮内膜症のマーカーとすることは、文献1（太田博孝，子宮内膜症および子宮腺筋症の診療における抗磷脂質抗体測定の有用度，SRL宝函，1992，Vol.16，No.2，Page.93-96 2. 結果）に記載されていることから特別な技術的な特徴とは認められない。したがって、請求項1～10に係る発明における抗シタキシム自己抗体の発現解析を行うことにより子宮内膜症を判定することに関する部分（第1発明）の特別な技術的特徴は、抗シタキシム抗体を子宮内膜症のマーカーとすることであり、請求項1～10に係る発明における抗PDIK1L自己抗体の発現解析を行うことにより子宮内膜症を判定することに関する部分（第2発明）の特別な技術的特徴は、抗PDIK1L抗体を子宮内膜症のマーカーとすることであり、請求項1～10に係る発明における抗エノラーゼ自己抗体の発現解析を行うことにより子宮内膜症を判定することに関する部分（第3発明）の特別な技術的特徴は、抗エノラーゼ抗体を子宮内膜症のマーカーとすることである。

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 阿部 康人  
愛媛県東温市志津川 国立大学法人愛媛大学内

(72)発明者 鍋田 基生  
愛媛県東温市志津川 国立大学法人愛媛大学内

(72)発明者 伊藤 昌春  
愛媛県東温市志津川 国立大学法人愛媛大学内

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	确定子宫内膜异位症的方法和诊断子宫内膜异位症的试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2010101047A1</a>	公开(公告)日	2012-09-06
申请号	JP2011502717	申请日	2010-02-23
申请(专利权)人(译)	持田製薬株式会社		
[标]发明人	阿部康人 鍋田基生 伊藤昌春		
发明人	阿部 康人 鍋田 基生 伊藤 昌春		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/57488 G01N33/6893 G01N2800/364		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/543.501.A		
代理人(译)	小林 浩 片山英二 铃木康仁		
优先权	2009054082 2009-03-06 JP 2009223493 2009-09-28 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明的目的是提供：一种用于确定子宫内膜异位的方法，其中可以使用来自受试者的血样，并且与仅使用常规方法的那些相比，能够以更高的灵敏度和更高的精度确定子宫内膜异位。常规的子宫内膜异位症标志物，例如CA125；以及用于实施本发明方法的诊断试剂盒。根据本发明的用于确定子宫内膜异位的方法包括：分析选自抗syntaxin自身抗体，抗PDIKIL自身抗体和抗烯醇酶自身抗体的至少一种的表达的步骤；以及基于所述表达分析的结果确定是否存在子宫内膜异位症的方法。

表1

疾病	人数	疾病	人数
卵巢囊肿	4	子宫内膜がん	1
子宫平滑筋腫	6	中隔子宮	1
卵管閉塞	2	原発性無月経(外一症候群)	1
卵巢がん	2	胎状奇胎	1